

**INFLUENCIA DE LA CEFALINA CRUDA SOBRE LA ACTIVIDAD
LITICA DEL PRECIPITADO DE EUGLOBULINA EN
DIVERSAS CONDICIONES (*)**

Influence of raw cephalin on the lytic activity of the euglobulin precipitate in different conditions.

VICTORIANO URIBE, MÓNICA BASS y ELIANA ISABEL CASTRO

*Laboratorio Central de Hematología, Hospital J. J. Aguirre, Universidad de Chile,
Santiago, Chile.*

Recibido para su publicación el 27 de Junio de 1967.

RESUMEN

Se estudió la influencia de la incubación, de la concentración de cefalina cruda y de la superficie de vidrio sobre la actividad fibrinolítica del precipitado de euglobulina del plasma humano.

La incubación independientemente o asociada a cefalina o a superficie de vidrio, aceleró significativamente el proceso de lisis espontánea de la euglobulina en medio con silicón. Diversas cantidades de cefalina y de superficie de vidrio, incorporadas independientemente al plasma antes de la precipitación isoeléctrica de la euglobulina aceleraron también significativamente la fibrinólisis. Cuando en ausencia de incubación, se asociaron altas concentraciones de cefalina con reducida área de vidrio la actividad resultante fue sinérgica, sin que el aumento de la superficie de vidrio lograra incrementar la fibrinólisis. Durante la incubación, cualquiera que fuese el área de vidrio que se asociara a cefalina no incrementó significativamente la lisis obtenida con las concentraciones respectivas de cefalina sola. Por lo tanto, la superficie de vidrio actúa de una vez y su actividad es limitada; en cambio la cefalina acelera la lisis en forma progresiva, sin haberse logrado un máximo con concentraciones que se encuentran en el extremo de lo fisiológico.

Cuando la superficie de vidrio intervino directamente en el precipitado de euglobulina, ya formado, sin haber estado en contacto con el plasma entero, no influyó sobre la lisis de la euglobulina. El efecto de la concentración de cefalina en las mismas condiciones, comparado con el de la cefalina añadida previamente al plasma perdió alrededor de los 2/3 de su actividad en los sistemas incubados, sin dejar de ser estadísticamente significativa y no la modificó en los sistemas sin incubación. En consecuencia, ambos factores ejercen influencia sobre la actividad fibrinolítica del precipitado de euglobulina mediante mecanismos diferentes: en tanto que la superficie de vidrio, como ya se había demostrado actúa sobre el sistema activador del plasminógeno, la cefalina parece hacerlo directamente sobre el proceso de transformación del plasminógeno en plasmina.

INTRODUCCIÓN

Si consideramos la relación entre el fenómeno de la fibrinólisis con la coagulación sanguínea, no es de extrañar que algunos factores procoagulantes o sus pro-

ductos de reacción intervengan en el proceso de la fibrinólisis. Así, se ha demostrado (1) que el factor XII (factor Hageman) activado, actúa como la lisoquinasa de la sangre, transformando el proactivador en activador del plasminógeno. Por otra parte, Seegers *et al.* (2, 3) aseveran que la molécula de protrombina puede dar origen a la trombina C, que es la enzima específica de la coagulación, y a la trombina E, que tiene actividad fi-

(*) Esta investigación fue financiada por la Facultad de Medicina, Universidad de Chile (Proyecto 61-18) y por la Fundación Rockefeller (Grant-60038) en un programa conjunto.

brinolítica. La adrenalina en pequeñas concentraciones (5-7 $\mu\text{g}/\text{kg}$) es procoagulante (4) y profibrinolítica (5). Aunque el Ca^{++} , de indiscutible acción procoagulante, favorece indirectamente la actividad de la antiplasmina, por intermedio de las plaquetas y de la pared vascular, puede estimular asimismo la fibrinólisis (6). Semejante dualidad de acción de aquéllos, y posiblemente de otros factores procoagulantes, además de asegurar la continuidad de ambos procesos podría desempeñar algún papel en la regulación del equilibrio dinámico en que aparentemente funcionan los sistemas de la coagulación y de la fibrinólisis in vivo (6, 7, 8, 9). Esto sería especialmente eficaz en el proceso de resolución de la microtrombosis antes de derivar a la trombosis propiamente tal (10).

Se ha comprobado (11) que la acción sinérgica de la cefalina cruda y el factor XII activado o factor superficie de contacto, logra una considerable aceleración del tiempo de coagulación del plasma nativo. Esto nos indujo a explorar la posibilidad que esta misma sinergia fuera similarmente válida para el proceso de la fibrinólisis. Sin embargo, era previo saber si la cefalina tiene o no actividad profibrinolítica. Como no encontramos en la literatura ningún dato pertinente, decidimos realizar esta investigación preliminar.

Se acepta generalmente que en la sangre se encuentra un activador lábil del plasminógeno (que puede ser neutralizado por un antiactivador) (12, 13) y además un proactivador (7, 14, 15, 16) que requiere la intervención de otras sustancias llamadas lisoquinasas, para transformarse en activador propiamente tal. Se han descrito lisoquinasas muy activas, como la estreptoquinasa y la estafiloquinasa, ajenas al plasma; pero aparte del factor XII activado por contacto no se conocen otras que sean propias de la sangre (1). En todo caso, estas últimas son poco activas in vitro e incapaces de superar la actividad de la antiplasmina del plasma. Es bien sabido que toda producción de plasmina en la sangre es neutralizada automáticamente por la antiplasmina (16), de tal modo que es necesario elevar por lo menos 20 veces la concentración del activador del plasminógeno para observar actividad fibrinolítica (17). Por lo tanto, si se desea estudiar esta actividad es preciso eliminar parcial o totalmente a la antiplasmina, lo que constitu-

ye la base de los métodos habitualmente empleados y del que hemos adoptado en los experimentos del presente trabajo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizó plasma de individuos de ambos sexos, cuyas edades fluctuaban entre 18 y 60 años, aparentemente sanos o, en su defecto, de pacientes con buen estado general, sin trastornos hepáticos, cardiovasculares, diátesis hemorrágicas ni hiperlipemia.

Las muestras de sangre se tomaron en ayunas, de una vena del pliego del codo y con el mínimo de éstasis. La sangre extraída se mezcló con solución de citrato de sodio al 3,8% en proporción de 9:1. El material empleado para la extracción y recepción de las muestras fue de vidrio Pyrex, o de plástico cubierto de silicón.

Las muestras de sangre se centrifugaban inmediatamente o dentro de 15 minutos a 4 000 revoluciones por minuto durante 10 minutos y el plasma obtenido se centrifugaba en la misma forma. A partir de este momento las pruebas se continuaban sin interrupción a la temperatura del laboratorio (alrededor de 20°C).

Para la centrifugación de la sangre se utilizaron tubos plásticos cubiertos de silicón de 15:105 mm, de 15 ml. Para la dilución y precipitación de la euglobulina, tubos del mismo material de 27:105 mm, o de vidrio sin silicón de 26:100 mm, de 50 ml (método 1 y 2 a), o bien tubos de vidrio Pyrex con o sin silicón o de 11:100 mm, de 9,5 ml (métodos 2 b y 3).

Para la determinación del tiempo de lisis se utilizaron tubos plásticos con silicón de 10:75 mm, de 5 ml, (método 1) y tubos de vidrio Pyrex de 11:100 de 9,5 ml con o sin silicón (métodos 2 a, 2 b y 3).

Citrato trisódico: al 3,8%.

Acido acético: al 1%.

Buffer de Owren (18) de pH 7,8.

Solución de Trombina, preparada en la siguiente forma: se pesa la cantidad de trombina Parke Davis equivalente a 1.000 U., se disuelve en 5 ml de una mezcla en partes iguales (v/v) de glicerina (Merck) y agua bidestilada y se reparte en porciones de 0,5 ml, que se conservan en un congelador a -26°C.

Cefalina: Se prepara a partir de tromboplastina de cerebro humano, según el método de Bell y Alton (18) en cantidades no mayores de 12,5 ml, que se reparten en fracciones de 1 ml y se conservan en el congelador de 20°C).

Silicón Dri-Film SC-87 General Electric, para el material de vidrio y silicón Dow Corning, para el material plástico.

Polvo de vidrio (11) 1 mg: corresponde a una superficie 5,8 cm^2 .

MÉTODOS. El método empleado fue una combinación de los métodos de lisis de la euglobina de von Kaulla (20) y de Iatridis y Ferguson (1), con tres variantes.

Método 1. Se toman dos series de 4 tubos siliconizados de 50 ml, en cada uno de los cuales se vierte 0,5 ml de plasma. En la pri-

mera serie, testigo, se agregan 0,2 ml de solución salina y en la segunda serie, la cantidad de cefalina en cada caso, suspendida en 0,2 ml de solución salina. A todos los tubos se añade oportunamente 9,2 ml de agua bidestilada y ácido acético al 1% gota a gota hasta bajar el pH a 5,8 ($\pm 0,02$) (medido potenciométricamente) agitando continuamente con agitador magnético.

El primer tubo de cada serie se centrifuga de inmediato a 4,000 rpm. durante 5 minutos, deteniendo la centrifuga con freno. Se vacía el sobrenadante secando cuidadosamente las paredes del tubo con tiras de papel filtro. Se disuelve el precipitado en 0,5 ml de buffer de Owren (pH 7,8). Se vierten 0,3 ml de esta solución opalescente en un tubo plástico en el cual se había medido previamente 0,01 ml de la solución de trombina (200 U/ml). Se mezcla agitando los tubos sin producir burbujas y se llevan de inmediato al baño a 37°C. La coagulación de la euglobulina se produce en menos de 15 segundos y en este instante se inicia la medida del tiempo. Se dejan los tubos en reposo. La iniciación de la lisis se reconoce por desprendimiento parcial o total del coágulo de las paredes del tubo, lo que es visible a trasluz, sin necesidad de retirarlos del baño. A partir de este momento los tubos se rotan suavemente hasta que la lisis sea total, lo que se registra como tiempo de lisis.

Se repite esta misma operación en cada uno de los tres tubos restantes de cada serie, después de transcurrir 1/2, 1 y 2 horas de iniciada la incubación.

Método 2. a) Se miden 1,25 ml de plasma en un tubo de 50 ml con o sin silicón. Se añade la sustancia problema (polvo de vidrio, cefalina) o en 0,5 ml de solución salina o sólo 0,5 ml de esta solución en los testigos. Se agrega 23 ml de agua bidestilada y aproximadamente 0,25 ml de la solución de ácido acético, agregado gota a gota con agitación continua hasta llegar a pH 5,8. Se centrifugan inmediatamente 6 ml de la mezcla (equivalente a 0,3 ml de plasma), en tubos de 9,5 ml con o sin silicón. El resto se incuba a 37°C y a la 1/2, 1 y 2 horas agitando previamente la mezcla, se extraen otros 6 ml cada vez; se centrifuga y los sedimentos respectivos se disuelven en 0,3 ml de buffer Owren. Se vierte con pipeta calibrada 0,01 ml de trombina, se agita y se continúa como en el método 1.

b) Una alternativa de este método, que se practicó cuando se utilizaba el polvo de vidrio, consiste en acidificar el agua bidestilada con la solución de ácido acético hasta lograr que 5,7 ml de agua acidulada añadidos a 0,3 ml de plasma bajen el pH a 5,8. Previamente se coloca en cada tubo de 9,5 ml el peso correspondiente de polvo de vidrio, solo o asociado a cefalina. Se añaden 0,3 ml de plasma y finalmente 5,7 ml de agua acidificada.

En los métodos 1 y 2, con sus variantes, la sustancia problema se vierte previamente al plasma y después de 5 a 10 minutos se procede a la precipitación isoeléctrica de la euglobulina por disolución y acidificación. Cuando se emplea polvo de vidrio en el sis-

tema incubado, los tubos se agitan cada 15 minutos. Los métodos 1 y 2 aplicados a la misma muestra dan resultados similares.

Método 3. Se mide en un recipiente cubierto con silicón la cantidad total de plasma requerida por el experimento, o sea 3 ml; se agrega 56,4 ml de agua bidestilada y aproximadamente 0,6 ml de ácido acético al 1%, hasta obtener un pH de 5,8. Se reparte inmediatamente en los tubos de 9,5 ml, con o sin silicón, que contienen el material en estudio, a razón de 6 ml por tubo (equivalente a 0,3 ml de plasma). Se continúa exactamente como en el método 2. El método 3 implica que las sustancias que se estudian no entran en contacto con el plasma entero sino con el precipitado de euglobulina ya formado.

Cuando se habla de una prueba en silicón, debe entenderse que todas las operaciones se ejecutan con material cubierto de este material (vidrio o plástico) con la única excepción de los electrodos del potenciómetro.

Cuando se trata de determinar la influencia de la superficie de contacto se emplean tubos de vidrio y polvo de vidrio de superficies conocidas. El menor contacto de vidrio está representado por la superficie del tubo que contiene el plasma y en el cual se hace la dilución y precipitación isoeléctrica más la superficie del tubo en que se reparte la mezcla con el precipitado. Esta superficie se ha mantenido igual en todas las pruebas, y corresponde a 112 cm² por ml de plasma. Para probar el efecto de mayor contacto se utilizó el polvo de vidrio en cantidades de 2 ó 10 ó 20 mg por ml de plasma, lo que representa un agregado de 11,6 ó de 58 ó de 116 cm² respectivamente. Si a esta superficie, calculada según el método de Nevo (21), se suma la superficie de los tubos, 112 cm², hace una superficie total de 124, ó 170, ó 228 cm², respectivamente.

En ensayos preliminares comprobamos que variando el pH de precipitación de la euglobulina de 5,3 a 6,1, el promedio del tiempo de lisis más corto se obtuvo a pH 5,8, por lo cual éste fue adoptado en todas las pruebas de esta investigación.

Finalmente conviene insistir en que todas las manipulaciones del plasma, antes de la adición de la cefalina o de la superficie de contacto, se ejecutan con material cubierto de silicón.

RESULTADOS

Se ha estudiado la influencia de tres factores: tiempo de incubación del precipitado de euglobulina, concentración de cefalina cruda y superficie de contacto, sobre el tiempo de lisis de la euglobulina. Estos factores se hicieron intervenir tanto separadamente como asociados.

Tiempo de incubación. Con el propósito de analizar la influencia del tiempo de incubación del precipitado de euglobulina, sin intervención de otros agentes, todas las manipulaciones se hicieron en ma-

TABLA I

Influencia de la concentración de cefalina y del tiempo de incubación sobre la actividad lítica del precipitado de euglobulina

(METODOS 1, 2a y 2b)

(Las cifras representan la media aritmética, \pm el error típico de los resultados expresados en 1000 veces la recíproca del tiempo de lisis en minutos)

Cefalina ($\mu\text{g/ml}$ de plasma)	I n c u b a c i ó n (h o r a s)			
	0	$\frac{1}{2}$	1	2
0	5,3 \pm 0,48	9,3 \pm 1,33	35 \pm 2,86	47 \pm 7,85
82	7,2 \pm 2,05	30,1 \pm 12,35*	40 \pm 6,69	75 \pm 16,98*
410	6,3 \pm 0,93	47,9 \pm 6,12	99 \pm 9,69	682 \pm 110,81
1650	13,4 \pm 3,04	109,5 \pm 23,81*	339 \pm 104,05	1438 \pm 237,02*

* Promedio de 6 a 8 experimentos.

Las cifras sin asteriscos corresponden a promedios de 12 a 29 experimentos.

terial cubierto de silicón y en el más breve lapso después de extraída la sangre (método 1). Se comparó el tiempo de lisis sin incubar y después de 1/2, 1 y 2 horas de incubación. La diferencia con el testigo sin incubar fue significativa. (Tabla I, línea 1). Esta influencia se manifestó también cuando se agregó previamente cefalina al plasma y cuando éste se puso en contacto con superficie de vidrio (Tabla II).

Debe notarse que, en la medida en que consideramos inerte la superficie cubierta de silicón, el sistema fibrinolítico ha experimentado una activación durante la incubación, a pesar de la ausencia del factor superficie de contacto o de cualquier otro agente extraño al plasma.

Superficie de vidrio. Como se muestra en la columna 2 de la Tabla II la aceleración del tiempo de lisis está relacionada con la superficie de vidrio que se ha pues-

to en contacto con el plasma y luego con el precipitado de euglobulina (Método 2 a y 2 b). La diferencia con el tiempo de lisis del testigo en medio siliconizado es significativa.

Si la superficie de vidrio se pone en contacto con el plasma, y luego se incuba con el precipitado de euglobulina, (columna 3, 4 y 5 de Tabla II), la aceleración del tiempo de lisis experimenta también incremento significativo con la magnitud del área de contacto. Las diferencias entre las cifras de estos resultados con respecto a la de los ensayos sin incubar son igualmente significativas.

Cefalina. La cefalina cruda agregada al plasma a la temperatura del laboratorio, 5 a 10 minutos antes de la precipitación de la euglobulina, ocasionó una aceleración significativa del tiempo de lisis (Tabla I). Este efecto se manifestó más claramente cuando el precipitado de euglo-

TABLA II

Influencia de la superficie de vidrio y del tiempo de incubación sobre la actividad lítica del precipitado de euglobulina

(METODOS 2a y 2b)

(Las cifras representan la media aritmética, \pm el error típico de los resultados expresados en 1000 veces la recíproca del tiempo de lisis en minutos)

Superficie de vidrio (cm^2/ml de plasma)	I n c u b a c i ó n (h o r a s)			
	0	$\frac{1}{2}$	1	2
0	5,3 \pm 0,48	9,3 \pm 1,33	35 \pm 2,86	47 \pm 7,85
112	6,4 \pm 0,63	13,4 \pm 2,30	26 \pm 2,94	65 \pm 15,65
124	6,7 \pm 0,93	16,2 \pm 2,65*	36 \pm 3,14	100 \pm 30,35*
170	12,6 \pm 1,20	51,0 \pm 13,03*	74 \pm 7,94	202 \pm 39,09*
228	19,6 \pm 1,97*	—	117 \pm 16,58	—

* Igual que en tabla 1.

bulina se incubaba a 37°C durante 1/2, 1 y 2 horas.

Como se muestra en la Tabla I, con la adición de 1,65 mg de cefalina por ml de plasma y una incubación de 2 horas, se logró bajar el tiempo de lisis a menos de 1 minuto, lo que representa un aumento de más de 250 veces la actividad del tístico sin cefalina ni incubación. Este tiempo de lisis es el más corto que hemos obtenido entre todos los sistemas ensayados. Vale la pena hacer hincapié en que en la mayoría de estas pruebas con máxima concentración de cefalina y de tiempo de incubación se notó que al agregar la trombina a la solución de euglobulina se formó un coágulo muy tenue, apenas perceptible. En algunos de estos casos repetimos la prueba, prolongando el tiempo de incubación o aumentando la cefalina, a tal punto que al agregar la trombina, ya no aparecía el coágulo de fibrina, lo que permite suponer que el fibrinógeno se habría alterado durante la incubación.

Efecto sinérgico. Como se ha visto existe un efecto sinérgico asociando la superficie de vidrio o bien la cefalina a la incubación del sistema a 37°C durante diversos períodos de tiempo. En la Tabla III se muestran los resultados obtenidos cuando se hizo actuar simultáneamente en el sistema diversas magnitudes de superficie de vidrio con concentraciones variables de cefalina sin incubación del precipitado de euglobulina o incubándolo durante 1 hora. Puede apreciarse que en presencia de pequeñas cantidades de cefalina, 82 mg/ml (línea 1 de Tabla III), prácticamente no se modificó o aumentó muy poco el efecto producido por la su-

perficie de vidrio (columna 2 y 4 de la Tabla II). Mientras que con concentraciones mayores de cefalina los resultados son diversos en los sistemas incubados y no incubados, en estos últimos se operó una clara sinergia, es decir, cuando se asociaron, por ejemplo, 1,65 mg de cefalina y 124 cm² de superficie de vidrio, la actividad fue prácticamente 40, contra 13,4 y 6,7 cuando se utilizaban en forma separada las mismas cantidades de cefalina y de superficie de vidrio respectivamente (Tabla I y II). Esta diferencia es estadísticamente significativa. Es notable que en estos mismos experimentos sin incubación, con 1,65 mg de cefalina, el incremento del área de superficie de vidrio no logró una mayor aceleración del tiempo de lisis (línea 3 de Tabla III).

En los sistemas incubados 1/2, 1 y 2 horas, empleando una concentración fija de cefalina (0,41 mg/ml), las variaciones que se produjeron en la actividad lítica por incorporación de distintas áreas de vidrio no resultaron significativas (Tabla IV). Aún más, en la Tabla I se puede comprobar que con 1,65 mg de cefalina por ml después de 1 hora de incubación, la activación obtenida del tiempo de lisis por cefalina sola corresponde a 339 ± 104, y asociada a superficie de vidrio a 305 ± 70, (Tabla III). Por lo tanto se confirma que en un sistema incubado la superficie de contacto no produce mayor estímulo de la fibrinólisis en el precipitado de euglobulina que el de altas concentraciones de cefalina, cuando ambas condiciones se estudian conjuntamente.

Cuando se emplea el método 3, es decir, cuando los factores en estudio (ce-

TABLA III

Influencia de la asociación de cefalina y superficie vidrio sin incubación y con 1 hora de incubación sobre la actividad lítica del precipitado de Euglobulina

(MÉTODOS 2b)

(Las cifras representan la media aritmética, ± el error típico de los resultados expresados en 1000 veces la recíproca del tiempo de lisis en minutos)

Cefalina (µg ml de plasma)	Sin incubación			1 hora de incubación		
	Superficie de vidrio (cm ² /ml de plasma)			Superficie de vidrio (cm ² /ml plasma)		
	124	170	228	124	170	228
82	7,7±1,75	14,9±2,93	19,4±2,68	40± 5,04	80±12,30	118±23,67
410	8,0±1,35	13,8±0,59	—	88±19,15	118±10,85	—
1650	39,9±4,17	40,4±5,12	41,4±4,49	233±59,25	259±54,93	305±70,22

Todas las cifras corresponden a promedios de 6 a 8 experimentos.

TABLA IV

Influencia de la superficie de vidrio y del tiempo de incubación sobre la actividad lítica del precipitado de euglobulina en presencia de cefalina (410 µg/ml)

(METODO 2b)

(Las cifras representan la media aritmética, ± el error típico de los resultados expresados en 1000 veces la recíproca del tiempo de lisis en minutos)

Superficie de vidrio (cm ² /ml de plasma)	I n c u b a c i ó n (h o r a s)			
	0	½	1	2
0	6,3 ± 0,93	47,9 ± 6,12	99 ± 9,69	682 ± 110,81
112	5,6 ± 0,90	41,8 ± 3,54	69 ± 12,72	746 ± 177,51
124	8,0 ± 1,35*	44,8 ± 8,82*	88 ± 19,15*	706 ± 335,85*
170	13,8 ± 0,59*	74,3 ± 9,36*	118 ± 10,85*	591 ± 259,75*

* Igual que en tabla 1.

falina y superficie de vidrio), sólo operan en el precipitado de euglobulina ya formado, sin entrar en contacto previo con el plasma entero, su acción sobre la actividad lítica de la euglobulina decayó considerablemente. En los ensayos sin incubación el aumento de la superficie de vidrio aceleró muy levemente, en forma no significativa, el tiempo de lisis de la euglobulina. En lo que se refiere a la influencia de la superficie de vidrio incubado 1 hora con el precipitado de euglobulina ya sea independientemente o asociada a cefalina es nula (Tabla V), por el contrario, el efecto de cefalina sin incubación no experimentó ningún cambio (Tabla V, columna 2), e incubando 1 hora sigue siendo significativo a pesar de reducirse a alrededor de 1/3 del efecto registrado cuando la cefalina se incorporaba previamente al plasma (Tabla V, columna 6).

DISCUSIÓN

El método elegido en el presente trabajo se prefirió a otros por ser de fácil manipulación y por conservar su sensibilidad a diversos niveles de actividad fibrinolítica. El precipitado de euglobulina resuspendido en la solución amortiguadora contiene, entre otras sustancias, glúcidos, sales minerales, lipoproteínas, fibrinógeno, proactivador, plasminógeno, factores de la coagulación e indicios de antiplasmina (17, 20). Como se ve, es una mezcla muy compleja en la cual faltan, además de la antiplasmina, muchos componentes del plasma, y los que están presentes pueden haber sufrido una desnaturalización parcial o total. En consecuencia, los hechos relatados en el presente trabajo, observados con el precipitado de euglobulina y no con el plasma o sangre entera, no son suficientes para afirmar o

TABLA V

Influencia de la concentración de Cefalina y de la superficie de vidrio sobre el tiempo de lisis de la Euglobulina sin contacto previo con el plasma

(METODO 3)

Cefalina (µg ml de plasma)	S i n i n c u b a c i ó n				1 h o r a d e i n c u b a c i ó n			
	Superficie de vidrio (cm ² /ml de plasma)				Superficie de vidrio (cm ² /ml plasma)			
	0	124	170	228	0	124	170	228
0	6,5±1,63	7,4±1,27	10,8±0,98	10,8±0,88	28± 5,56	23± 2,73	30± 4,75	29± 6,14
82	8,4±3,16	9,0±1,43	12,0±1,08	12,0±1,11	38± 6,57	32± 3,89	35± 4,41	34± 9,80
1650	14,6±5,17	12,0±1,75	15,0±2,23	16,0±1,72	122±44,62	90±14,92	88±19,06	97±24,43

Todas las cifras corresponden a promedios de 6 a 8 experimentos.

negar que deban atribuirse a la sola circunstancia de haber excluido del sistema a la antiplasmina.

La actividad lítica mostrada en el experimento de la Tabla I, línea 1, realizado en medio con silicón, podría corresponder a la supuesta fibrinólisis fisiológica que se atribuye a la presencia del mencionado acelerador lábil del plasma (Fearnley (20), Mac Farlane (13), Flute (17)). Cuando se introduce en el sistema el factor superficie de contacto (superficie del tubo o superficie del tubo más polvo de vidrio) se logra una activación suplementaria, tanto en la mezcla no incubada como en la incubada. Si aceptamos el punto de vista de Iatridis y Ferguson (1) que la aceleración de la lisis del sistema incubado en presencia de kaolin, se debe a la acción de la superficie de contacto, tenemos que convenir que cuando el sistema se incubaba en medio siliconizado, en que el factor XII permanece inactivo, la aceleración de la lisis de la euglobulina tiene que obedecer a otro mecanismo (¿activador lábil?). Sin embargo, semejante postulado no se concilia con la observación de aquellos autores que en plasma deficiente en factor XII el sistema de la euglobulina no experimenta, durante la incubación, en presencia o ausencia de kaolin, la más mínima aceleración de la lisis. Ello podría significar que el sistema activador de la plasmina está bloqueado, por ejemplo, mediante un inhibidor (22, 23), lo que no acontece con la sola presencia del factor XII, aunque no esté necesariamente activado. Esta interpretación concuerda con el comportamiento del plasma de pollo, mostrado por los mismos autores, que, como es sabido, carece de factor XII y de proactivador. Ocurre que, al revés del plasma humano, a medida que aumenta el tiempo de incubación del precipitado de euglobulina, el tiempo de lisis se prolonga progresivamente.

Nuestros resultados experimentales demuestran suficientemente que la cefalina es un activo acelerador de la lisis de la euglobulina, sin que se pueda establecer nada sobre la naturaleza íntima de esta acción. No obstante es claro que la cefalina y la superficie de vidrio influyen en la lisis de la euglobulina por mecanismos distintos. En tanto que la primera desarrolla su mayor actividad durante la incubación del precipitado de euglobuli-

na, la superficie de vidrio actúa de una vez en el instante que se pone en contacto con el plasma entero (24). El aumento de la lisis observado durante la incubación parece secundario a la tasa de activación de los activadores desencadenada por dicha superficie en el momento inicial. Esto explica que la sinergia en la acción conjunta de la cefalina y la superficie de vidrio sobre la lisis de la euglobulina opera solamente en los sistemas sin incubación.

El hecho que la superficie de vidrio, contrariamente a lo observado con la cefalina, carezca de toda actividad, cuando se agrega al precipitado de euglobulina ya formado, sin haber estado en contacto del plasma entero concuerda con la hipótesis que la superficie de contacto influye en los activadores del plasminógeno por activación previa del factor XII. En cambio, la acción de la cefalina no parece recaer sobre el sistema activador sino directamente y en forma constante sobre la transformación del plasminógeno en plasmina.

Es oportuno señalar que estos mismos factores, en iguales concentraciones, actúan en forma similar en la coagulación. En efecto, en un trabajo precedente (11) demostramos que el aumento de la concentración de polvo de vidrio acelera progresivamente el tiempo de coagulación del plasma nativo hasta un óptimo (10 a 20 $\mu\text{g/ml}$), de modo que un mayor incremento de la superficie de contacto lejos de acelerar la coagulación, la inhibe, a la vez que disminuye el consumo de protrombina. En cambio, la cefalina disminuye el tiempo de coagulación y aumenta el consumo de protrombina en relación directa a su concentración.

En la literatura revisada no hemos encontrado ningún trabajo que concierna específicamente a la influencia de las cefalinas en la fibrinólisis. Unos pocos relatos hacen referencia a la acción de los fosfolípidos en general y sus conclusiones son contradictorias, predominando aquellas que los consideran, igual que las lipoproteínas que los contienen, como indiferentes o inhibidores de la fibrinólisis (7, 25, 26, 27).

Recientemente se ha demostrado que varios agentes estimulan la actividad fibrinolítica de la sangre a través de un mecanismo aún desconocido. Entre éstos puede mencionarse el ejercicio físico (28,

29), la adrenalina (5, 14, 30), los corticoesteroides (cortisona, prednisona) (30), la heparina en pequeñas concentraciones (31) y algunas drogas como la fenformina (30). No es verosímil que esta diversidad de agentes actúe integrando el sistema enzimático de la fibrinólisis, sino en forma indirecta, neutralizando la antiplasmina u otro inhibidor (22, 23) o bien activando el sistema kalikreina-kinina que a su vez activa el sistema fibrinolítico (32).

Sustancias de doble acción procoagulante y profibrinolítica podrían intervenir en algunos fenómenos patológicos como, por ejemplo, en la coagulación intravascular diseminada o reacción de Schwartzman (9, 33) ya sea experimental o como consecuencia de estados patológicos del hombre. En tales casos se ha comprobado la existencia de reacciones anticoagulantes por liberación de los productos de desintegración del fibrinógeno (35, 36) y, a menudo, la aparición de actividad fibrinolítica en la sangre. Ambos mecanismos pueden dar lugar a estados hemorrágicos graves que no se producen si antes de provocar la reacción de Schwartzman, el animal es tratado con heparina o con preparados fibrinolíticos (estreptoquinasa) (34). Es probable que en esta clase de reacciones intervenga también la cefalina que es un componente de la tromboplastina, del líquido amniótico y de los eritrocitos incompatibles, todos agentes que han demostrado ser desencadenantes de la reacción de Schwartzman.

Hasta el momento nos hemos referido a la actividad de la cefalina cruda que en realidad, es un complejo de varios fosfolípidos (ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, esfingomielina, lisofosfatidilcolina, plasmalógeno, etc.), junto con otros lípidos, glúcidos y aún vestigios de sustancias no identificadas (37, 38). De este modo, la actividad fibrinolítica que hemos mostrado no puede atribuirse sino provisionalmente a las cefalinas (fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina) en tanto no se haga un estudio del material purificado.

En trabajos preliminares, actualmente en desarrollo, empleando cromatografía en capa fina hemos encontrado que diversas fracciones del cromatograma de cefalina cruda estimulan la actividad fibrinolítica de la euglobulina.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Prof. Jorge Mardones R. sus valiosas sugerencias para la mejor expresión de los resultados del presente trabajo.

SUMMARY

The influence of the concentration of raw cephalin and of incubation time on the fibrinolytic activity of the precipitate of human plasma euglobulin was studied, and compared with the effect induced by the contact with glass surface in the same conditions.

Incubation of the precipitate either independently (Table I, line 1) or associated with different concentrations of cephalin (line 2 to 4) or contact with glass surface (line 2 to 5), increased significantly the speed of euglobulin lysis in a siliconized medium.

When cephalin (Table I) or glass powder were added to the whole plasma 5 or 10 minutes before the isoelectric precipitation of euglobulin a significant acceleration of fibrinolysis was observed, either by incubating the euglobulin precipitate or not. The association of a high concentration of cephalin (1.65 mg) with a reduced surface area (124 cm²) without incubation resulted in a synergistic effect; the increase of glass surface (to 170 or 228 cm²) did not accelerate the lytic activity.

When euglobulin was incubated one hour, the glass area associated with different concentrations of cephalin (Table III and IV) did not modify significantly the lytic activity obtained with the same concentration of cephalin alone in the same conditions (Table I). Consequently, the glass surface seems to give an immediate and limited impulse to the process of euglobulin lysis (concentration of proactivator). On the other hand, the increase in cephalin concentration up to the highest physiological level progressively accelerated the lysis, without having reached a maximum with the concentrations here used.

When the glass powder was added to the already formed euglobulin precipitate without previous contact with the whole plasma (Method 3), no modification of the lysis of euglobulin was observed (Table V, line 1). In equivalent conditions the effect of cephalin (1.65 mg) was only

one third of the obtained when it was previously added to the plasma (Table V, columns 2 and 6).

These results show that the effect of cephalin and of glass surface on the fibrinolytic activity of the euglobulin precipitate corresponds to different mechanisms. While the glass surface, as has been postulated, influences the proactivator system of plasminogen, cephalin seems to act directly on the conversion of plasminogen into plasmin.

REFERENCIAS

- 1.—IATRIDIS, S. G. y FERGUSON, J. H. — *J. Clin. Invest.* **41**:1277, 1962.
- 2.—SEEGERS, W. H., LANDABURÚ, R. H. y JOHNSON, J. F. — "Fibrinolytic properties of thrombin". *Blood Coagulation: Collected papers by Walter H. Seegers and associates 1957-1960.*
- 3.—SEEGERS, W. H., LANDABURÚ, R. H. y JOHNSON, J. F. — *Science* **131**:726, 1960.
- 4.—ROWSSELL, H. C., HEGARDT, B., DOWNIE, H. S., MUSTARD, J. F. y MURPHY, E. A. — *Brit. J. Haematol.* **12**:66, 1966.
- 5.—THOMSON, W. B., GREEN, J. y LYNNEVANS, I. — *J. Clin. Path.* **17**:341, 1964.
- 6.—STAFFORD, J. L. — *Brit. Med. Bull.* **20**:179, 1964.
- 7.—KONTTINEN, Y. P. — *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **17**: symp. 82, 1965.
- 8.—HODGSON, G. y URIBE, V. — "Alteraciones generales de la sangre y de los órganos hematopoyéticos", en "Patología Funcional" de Günther, B. y Talesnik, J. Ed. Universidad de Chile, Santiago, Chile, 1963.
- 9.—HARDAWAY, R. M. y MCKAY, D. G. — *Rev. Surgery* **20**:297, 1963.
- 10.—OTHA, G., KITUCHI, T. y KIRIMURA, S. — "The role of endothelium in pathogenesis of thrombosis". *Proc. International Congress of Hematol.*, 1960. Ed. Pan-Pacific Press-Tokyo, 1962, pág. 1834.
- 11.—URIBE, V. y CASTRO, E. I. — *Sangre* **10**:269, 1965.
- 12.—MACFARLANE, R. C. — *Brit. Med. Bull.* **20**:173, 1964.
- 13.—FEARNLEY, G. R. — *Brit. Med. Bull.* **20**:185, 1964.
- 14.—ASTRUP, T. — *Blood* **11**:781, 1956.
- 15.—BLIX, S. — *Acta Med. Scandinav.* **171**:83, 1962.
- 16.—FAERNLEY, G. R. — *J. Clin. Path.* **17**:305, 1964.
- 17.—FLUTE, P. T. — *Brit. Med. Bull.* **20**:195, 1964.
- 18.—OWREN, P. A. — *Acta Med. Scandinav. Suppl.* **194**, 1947.
- 19.—BELL, W. N. y ALTON, H. S. — *Nature* **174**:880, 1954.
- 20.—VON KAULLA, K. N. y SCHULTZ, R. L. — *Am. J. Clin. Path.* **29**:104, 1958.
- 21.—NEVO, A., DE VRIES, A. y KATCHASKY, A. — *Biochim. et. Biophys. Acta* **17**:536, 1965.
- 22.—DUDOK, DE WIT, Chr. — *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **12**:105, 1964.
- 23.—NILSSON, I. M., KROOK, H., STERNBY, N. H., SODERBERG, E. y SODERSTROM, N. — *Acta Med. Scandinav.*, **169**:323, 1961.
- 24.—SPAET, T. H. — *Blood* **27**:112, 1966.
- 25.—FARGUHAR, J. W., MERIGAN, T. C. y SOKOLOW, M. — *J. Exp. Med.* **113**:587, 1961.
- 26.—GREIG, H. B. W. y CORNELIUS, E. M. — *Brit. J. Exp. Path.* **42**:568, 1961.
- 27.—HOWELL, M. — *Brit. Med. Bull.* **20**:200, 1964.
- 28.—EGEBERG, O. — *Scandinav. J. Clin. Lab. Invest.* **15**:273, 1963.
- 29.—EGEBERG, O. — *Scandinav. J. Clin. Lab. Invest.* **15**:539, 1963.
- 30.—FEARNLEY, G. R. y CHAKRABATI, R. — *J. Clin. Path.* **17**:328, 1964.
- 31.—KAULLA, K. N. von. — Citado por Moses C. "Atherosclerosis". Ed. Lea and Febiger, Philadelphia, pág. 54, 1963.
- 32.—LEWIS, G. P. — *Physiol. Rev.* **40**:647, 1960.
- 33.—MCKAY, D. G., GITHIN, D. y GRAIG, J. M. — *A. M. A. Arch. Path.* **67**:270, 1959.
- 34.—KLIMAN, A. y MCKAY, D. S. — *A. M. A. Arch. Path.* **66**:715, 1958.
- 35.—KOWALLSKY, F., BUDZYNSKY, A. Z., KOPEC, M., LATALLO, Z. S., LIPINSKI, B. y WEGRZYNOWICZ, Z. — *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **12**:69, 1964.
- 36.—KOWALLSKY, F., BUDZYNSKY, A. Z., KOPEC, M., LATALLO, Z. S., LIPINSKI, B. y WEGRZYNOWICZ, Z. — *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **13**:12, 1965.
- 37.—MALINS, D. C. — *Prog. Chem. Fats* **8**:303, 1966.
- 38.—BILLIMORIA, J. D., IRANI, V. J. y MACLAGAN, N. F. — *J. Atherosclerosis Res.* **5**:90, 1965.